

*И.В.Двораковская, Н.А.Кузубова, А.М.Фионик, И.С.Платонова, Е.С.Лебедева, Л.Н.Данилов*

## Патологическая анатомия бронхов и респираторной ткани крыс при воздействии диоксида азота

НИИ пульмонологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова: 197089, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, 6 / 8

*I.V.Dvorakovskaya, N.A.Kuzubova, A.M.Fionik, I.S.Platonova, E.S.Lebedeva, L.N.Danilov*

## Morphological investigation of respiratory tract in rats affected by nitrogen dioxide

### Summary

The study was performed in 120 Wistar male rats. Animals were exposed to nitrogen dioxide for 15, 30, 60 or 90 days. Ten intact rats were as controls for each exposed group. Histological examination was performed using immunohistochemistry and morphometry. Pathological changes developed simultaneously in all lung structures. After 15-day exposition with nitrogen dioxide, acute changes have been observed, such as oedema, mucosal thickening and inflammation, enhanced bronchial secretion. In 30 days, morphological features reflected a subacute stage. In 60 days of exposition, inflammation became chronic with sclerosis of bronchial wall followed by worsening of the pathology and occurrence of panacinar emphysema if exposition was prolonged to 90 days.

**Key words:** respiratory tract, morphology, nitrogen dioxide.

### Резюме

Проводилось экспериментальное исследование на 120 крысах-самцах. Животные подвергались экспозициям диоксида азота с различными сроками воздействия: 15, 30, 60 и 90 дней. Контролем в каждой группе служили 10 интактных крыс. Было проведено гистологическое исследование легких крыс с применением иммуногистохимических и морфометрических исследований. Выявлено, что патологический процесс во всех легочных структурах развивается одновременно, при этом после 15-дневного воздействия диоксидом азота развиваются острые процессы (отек, утолщение и инфильтрация слизистой, усиление бронхиальной секреции). Через 30 дней морфологические изменения соответствуют подострой стадии. Спустя 60 дней происходит хронизация воспалительного процесса со склерозированием стенок бронхов с последующим прогрессированием и формированием панацинарной эмфиземы при удлинении экспозиции до 90 дней.

**Ключевые слова:** бронхолегочный аппарат, морфология, диоксид азота.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), исследования в этой области по-прежнему актуальны. Наиболее сложными и спорными остаются вопросы патогенеза. Их изучение определяет профилактику, лечебные мероприятия и решения прогноза. В патогенезе развития ХОБЛ важное значение имеет нарушение функции местной защитной системы легких, а именно состояние реснитчатых клеток, реологических свойств слизи, альвеолярных макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов и др. [1–3]. В связи с этим представляет интерес комплексное морфофункциональное изучение легочных структур в динамике на органном, тканевом и клеточном уровне в эксперименте.

Трудность моделирования ХОБЛ обусловлена гетерогенностью и полиэтиологичностью этого заболевания, при котором различные факторы и патогенетические пути приводят к одному исходу – формированию хронического воспаления, поражению мелких бронхов и деструкции легочной паренхимы. Однако именно метод моделирования позволяет проследить за прогрессированием морфологических изменений в легких, развитием обструкции и процессов ремоделирования, оценить эффективность и безопасность медикаментозных препаратов, определить терапевтические мишени для разработки новых средств лечения и профилактики.

Наиболее предпочтительным агентом для инициации повреждения легких с последующим развитием воспаления и формированием характерных для ХОБЛ признаков представляется оксидантный поллютант диоксид азота ( $\text{NO}_2$ ).

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 120 крысах-самцах линии Вистар. Животные подвергались 30-минутным экспозициям  $\text{NO}_2$  3 раза в день с интервалом между экспозициями 30 мин. Прерывистый режим экспозиции был обусловлен необходимостью проветривания камеры от накапливающегося при дыхании животных углекислого газа. Животные были разбиты на 4 группы в зависимости от сроков воздействия  $\text{NO}_2$ : 15 дней ( $n = 20$ ), 30 ( $n = 20$ ), 60 ( $n = 20$ ) и 90 ( $n = 20$ ) дней. Контролем в каждой группе служили 10 интактных крыс, которые на те же сроки помещались в аналогичную камеру, заполненную воздухом, и не подвергались воздействию  $\text{NO}_2$ .

Легкие фиксировали в 10%-ном формалине, после проводки кусочки заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону с докраской на эластик. Проведено иммуногистохимическое исследование для выявления Т-лимфоцитов (CD3) и макрофагов (CD68). По экспрессии

CD3 в каждом поле зрения в стенке бронха и перибронхиальной зоне (расстояние от стенки до 20 мкм) подсчитывали количество Т-лимфоцитов и приводили к периметру стенки бронха по формуле: количество лимфоцитов  $\times 1\,000$  / периметр стенки бронха.

Для морфометрических исследований легкого использовался компьютерный анализатор изображения. С использованием возможностей компьютерной системы анализа изображения *Leica Qwin Pro* определяли площадь легочной паренхимы и просвета альвеол в процентах к площади изображения, а также периметр стенки бронхов в микронах. Обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ *Statistica 6.0 for Windows* [4].

Значимость различий между средними величинами оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и считалась статистически достоверной при  $p \leq 0,05$  (исследование, аналогичное 1-факторному дисперсионному анализу).

Морфометрический анализ проведен с помощью программного пакета "Видеотест-Морфо". На основании контрастности цветов вычислялись: удельная площадь межалвеолярных перегородок с наличием фиброзной ткани в них, площадь фиброзной ткани в стенке долевого бронха и легочной артерии. Для статистической обработки использовался пакет прикладных программ *Statistica 6.0 for Windows*. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

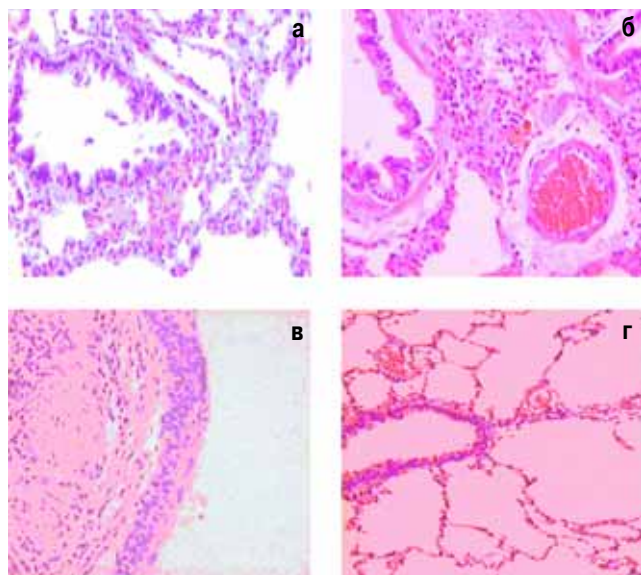


Рис. 1: а — экспозиция 15 дней; гиперплазия бокаловидных клеток, десквамация эпителия, отек и клеточная инфильтрация интерстиция; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 120$ ; б — экспозиция 30 дней; гиперплазия бокаловидных клеток, лимфо-лейкоцитарная инфильтрация в перибронхиальной и периваскулярной ткани, эритроцитарные стазы; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 120$ ; в — экспозиция 60 дней; плоскоклеточная метаплазия, склероз собственного слоя, клеточная, преимущественно лимфоцитарная инфильтрация; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 120$ ; г — экспозиция 60 дней. Атрофические изменения мелкого бронха, расширение просветов сосудов, участки перерастяжения альвеол; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 120$

## Результаты

При гистологическом исследовании контрольной группы в легочной ткани субплеврально наблюдались очаговые скопления лимфоцитов с образованием фолликулов как в интерстиции, так и вокруг мелких сосудов. Слизистая оболочка бронхов имела типичное строение с выстилкой цилиндрическим многорядным эпителием. В отдельных случаях в подслизистом слое отмечалась умеренная плазмоцитарно-лимфоцитарная инфильтрация. В просвете части дилатированных сосудов определялись эритроциты.

### Экспозиция $\text{NO}_2$ — 15 дней

В просветах крупных и мелких бронхов сохранялась складчатость слизистой оболочки, характерная для интактных животных. Выявлялись отек подслизистого слоя бронхов, участки перерастяжения легочной ткани, пласты десквамированного эпителия. У половины животных выявлялись гиперплазия бокаловидных клеток в эпителии крупных бронхов, отек и клеточная инфильтрация интерстиция, расширение лимфатических сосудов (рис. 1а). В инфильтратах преобладали гистиоциты с примесью лимфоцитов и единичных нейтрофилов. Встречалась очаговая инфильтрация межалвеолярных перегородок с набуханием альвеолярного эпителия и скопления макрофагов в просветах альвеол.

### Экспозиция $\text{NO}_2$ — 30 дней

В стенках крупных бронхов: отек, лимфоцитарно-лейкоцитарная инфильтрация подслизистого слоя, дистрофические изменения в эпителии бронхиальных желез. Инфильтрация лейкоцитами с примесью лимфоцитов и плазмоцитов выявлялась в перибронхиальной и периваскулярной соединительной ткани, в сосудах — эритроцитарные стазы (рис. 1б). Неравномерные изменения отмечались на уровне мелких бронхов — от расширения просвета с истончением стенки и атрофии мышечной пластинки до спазмирования просвета с сохранением складчатости слизистой. В респираторной части легких выявлялись участки перерастяжения и зоны, в которых межалвеолярные перегородки были утолщены и инфильтрированы лимфоцитами.

### Экспозиция $\text{NO}_2$ — 60 дней

В легких крыс обнаружены проявления хронического воспаления. Встречались участки сочетания атрофии и плоскоклеточной метаплазии бронхиального эпителия, в собственном слое — умеренно выраженная лимфомоноцитарная инфильтрация, очаги склероза (рис. 1в), бронхиальные железы — с дистрофическими и атрофическими изменениями эпителия.

Мышечные элементы стенок бронхов разобщены рыхлой соединительной тканью, богатой капиллярами. Мелкие бронхи — с дилатацией и / или сужением просвета, атрофией эпителия. Межалвеолярные перегородки были неравномерно утолщены, с клеточной инфильтрацией (преимущественно лимфоцитами

и гистиоцитами). Респираторные бронхиолы и альвеолярные ходы с очагами расширения (рис. 1г), субплеврально имелись участки иррегулярной эмфиземы. В мелких и крупных сосудах отмечались умеренно выраженные дисциркуляторные нарушения кровообращения, перикалибровка сосудов, в отдельных участках — редукция капиллярного русла в межалвеолярных перегородках.

При иммуногистохимическом исследовании клеточного инфильтрата выявлена экспрессия CD3 и CD68 (рис. 2а, б).

#### Экспозиция $\text{NO}_2$ — 90 дней

В легких при отсутствии принципиальных отличий от предыдущей морфологической картины выявлены морфологические признаки хронизации и прогрессии процесса с развитием панацинарной эмфиземы. В крупных бронхах определялась незначительная складчатость эпителиальной выстилки, в других случаях — сглаженность слизистой оболочки, ее истончение (уменьшение рядов клеток), увеличивалось количество бокаловидных клеток, местами присутствовала очаговая гиперплазия реснитчатого эпителия. В строме стенки бронха выявлялся неравномерный склероз, в отдельных случаях — с диффузной лимфомоноцитарной инфильтрацией различной степени выраженности, а также гиперплазия лимфоидных образований (рис. 2в). В мелких бронхах склероз стенки был умеренным (в отличие от срока 60 дней) и имела тенденция к атрофии мышечной пластинки — местами с лимфомоноцитарной инфильтрацией в наружных отделах. В субплевральных отделах, перибронхиальных и прикорневых зонах легочной паренхимы обнаруживались участки панацинарной эмфиземы (рис. 2г), истончение меж-

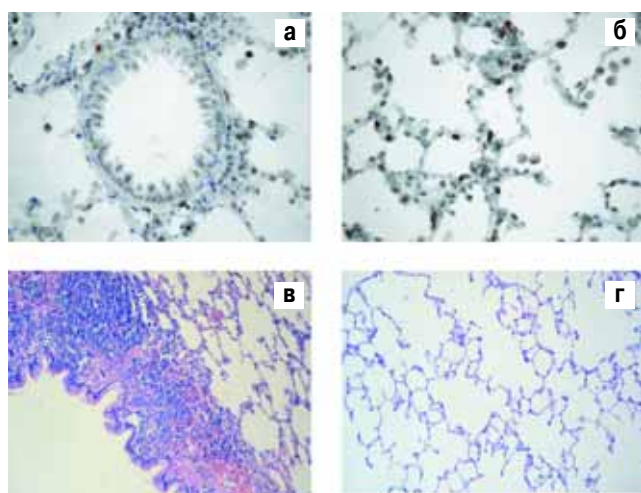


Рис. 2: а — экспозиция 60 дней; экспрессия CD3 в стенке бронха и перибронхиальной ткани,  $\times 120$ ; б — экспрессия 60 дней; CD68 в просветах альвеол и интерстиции,  $\times 120$ ; в — экспозиция 90 дней; гипертрофия складок слизистой оболочки, стенка бронха утолщена, с диффузной лимфоцитарной инфильтрацией и образованием фолликул, полнокровие мелких сосудов с участками периваскулярных кровоизлияний; участки эмфиземы, полнокровие микрососудов; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 120$ ; г — экспозиция 90 дней; панацинарная эмфизема; окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

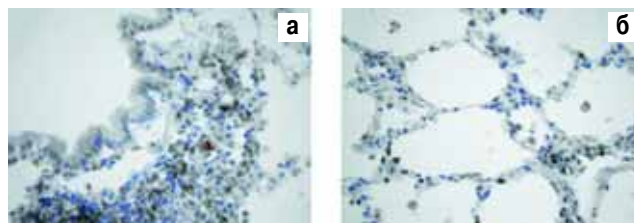


Рис. 3: а — экспозиция 90 дней; экспрессия CD3 в стенке бронха и перибронхиальной ткани,  $\times 120$ ; б — экспозиция 90 дней; экспрессия CD68 преимущественно в интерстиции,  $\times 120$

альвеолярных перегородок, уменьшение числа функционирующих капилляров, в части просветов альвеол — мелкие скопления макрофагов. Просветы крупных и мелких сосудов были расширены, кровенаполнение было неравномерным, мышечная оболочка тонкая или с очагами утолщения, в стенке мелких сосудов и периваскулярно — смешанная лимфомоноцитарная инфильтрация с небольшим числом лейкоцитов. В клетках инфильтрата постоянно выявлялась экспрессия CD3 и CD68 (рис. 3а, б).

При количественной и качественной оценке клеточного инфильтрата в стенке бронха были получены статистически достоверные различия показателей экспрессии CD3. После 60 дней воздействия  $\text{NO}_2$  число лимфоцитов значительно возросло ( $61,6 \pm 1,59$ ) в сравнении с контрольной группой ( $28,1 \pm 2,36$ ); после 90-дневной экспозиции число лимфоцитов снижалось ( $47,1 \pm 5,30$ ), но оставалось выше контрольного значения (рис. 4).

В интерстициальной ткани легких не было зарегистрировано статистически достоверное увеличение числа Т-лимфоцитов, хотя можно говорить о тенденции к возрастанию экспрессии CD3 в группе крыс с 90-дневной экспозицией  $\text{NO}_2$ :  $19,1 \pm 3,8$  (контроль),  $20,9 \pm 3,5$  (60 дней  $\text{NO}_2$ ),  $26,0 \pm 3,6$  (90 дней  $\text{NO}_2$ ).

Экспрессия макрофагов CD68 в легочном интерстиции снижалась после 60 дней воздействия  $\text{NO}_2$  до  $2,30 \pm 0,43$  (в контроле —  $4,15 \pm 1,65$ ;  $p > 0,05$ ) и возрастала после 90-дневной экспозиции  $\text{NO}_2$  ( $8,93 \pm 2,33$ ;  $p > 0,05$ ). Макрофаги в просвете бронхов (пристеночные и свободные) выявлялись преимущест-

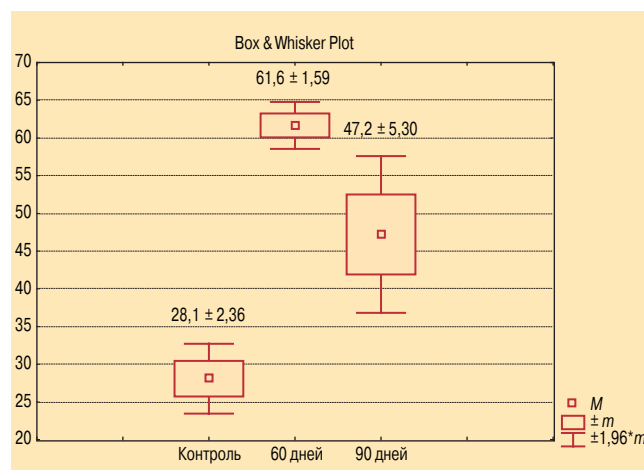


Рис. 4. Количество лимфоцитов в стенке мелких и средних бронхов после различных сроков воздействия  $\text{NO}_2$



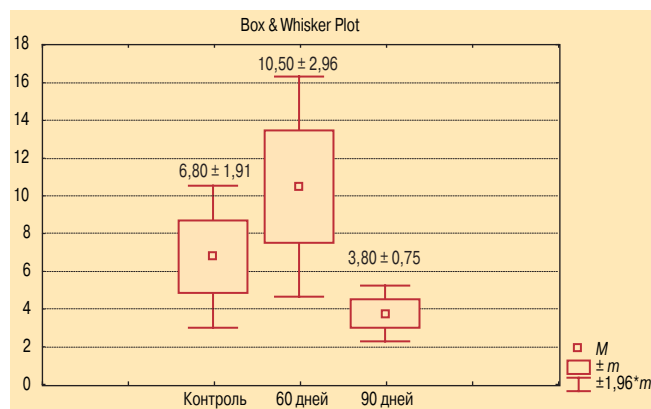


Рис. 5. Сравнение соотношения количества лимфоцитов и макрофагов после различных сроков воздействия  $\text{NO}_2$

венно на 90-й день эксперимента. Вероятно, через 60 дней воздействия  $\text{NO}_2$  начиналась миграция альвеолярных макрофагов из паренхимы в стенку бронха и его просвет, а первоначальная их активация происходила именно в легочной паренхиме.

Определяя отношения количества Т-лимфоцитов к числу макрофагов в интерстиции легкого, выявили тенденцию к увеличению этого показателя у крыс после 60-дневной экспозиции  $\text{NO}_2$  ( $10,51 \pm 2,96$  vs  $6,82 \pm 1,91$  в контроле;  $p < 0,05$ ) с последующим снижением до  $3,82 \pm 0,75$  (90 дней  $\text{NO}_2$ ;  $p < 0,05$ ), как показано на рис. 5.

Таким образом, результаты иммуногистохимического исследования свидетельствуют об участии в воспалительном процессе не только клеток врожденного (прежде всего, альвеолярных макрофагов), но и адаптивного иммунитета (Т-лимфоцитов), что свидетельствует о формировании хронического воспаления у экспериментальных животных на 60–90-й дни воздействия ингаляционного оксиданта  $\text{NO}_2$ .

Изменения в легких были подтверждены результатами морфометрического исследования. В течение первых 30 дней воздействия  $\text{NO}_2$  удельная площадь межальвеолярных перегородок практически не изменялась. После 60-дневной экспозиции она уменьшилась в 2 раза по сравнению с контролем, что свидетельствовало об истончении межальвеолярных перегородок и перерастяжении легочной ткани (табл. 1).

Определяя количество фиброзной ткани в стенке бронха, легочной артерии и межальвеолярных пе-

**Таблица 1**  
*Удельная площадь межальвеолярных перегородок в легких крыс после различных сроков воздействия  $\text{NO}_2$  ( $M \pm m$ )*

Группы животных	Удельная площадь межальвеолярных перегородок, %
Контроль	$26,64 \pm 3,11$
15 дней $\text{NO}_2$	$21,51 \pm 4,85$
30 дней $\text{NO}_2$	$28,51 \pm 4,62$
60 дней $\text{NO}_2$	$14,34 \pm 3,11^*$
90 дней $\text{NO}_2$	$17,35 \pm 3,09^*$

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

**Таблица 2**  
*Выраженность развития фиброзной ткани в стенке долевого бронха, легочной артерии и межальвеолярных перегородках после различных сроков воздействия  $\text{NO}_2$  ( $M \pm m$ )*

Группы животных	Стенка бронха, пиксели	Стенка артерии, пиксели	Межальвеолярные перегородки, пиксели
Контроль	$3,69 \pm 0,01$	$4,01 \pm 0,01$	$3,29 \pm 0,02$
15 дней $\text{NO}_2$	$4,20 \pm 0,13$	$4,53 \pm 0,11$	$3,79 \pm 0,09$
30 дней $\text{NO}_2$	$4,54 \pm 0,10$	$4,33 \pm 0,09$	$4,04 \pm 0,09$
60 дней $\text{NO}_2$	$4,96 \pm 0,03^*$	$4,74 \pm 0,02^*$	$5,30 \pm 0,04^*$
90 дней $\text{NO}_2$	$7,78 \pm 0,11^*$	$8,06 \pm 0,09^*$	$5,13 \pm 0,09^*$

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

регородках, не выявили достоверных изменений в группах животных с 15- и 30-дневной экспозицией  $\text{NO}_2$ , по сравнению с контролем (табл. 2). В группе с 60-дневной экспозицией  $\text{NO}_2$  более чем в 50 % исследуемого материала регистрировали статистически достоверное увеличение количества фиброзной ткани во всех исследуемых структурных элементах легких. Наиболее значительным развитие фиброзной ткани в стенках бронхов и легочных артерий было при продлении воздействия  $\text{NO}_2$  до 90 дней.

## Заключение

Оценивая морфологические изменения, происходящие в легочной ткани на протяжении длительного воздействия  $\text{NO}_2$ , можно сделать следующие выводы:

1. Патологический процесс возникает одновременно и развивается параллельно во всех легочных структурах.
2. После 15 дней воздействия  $\text{NO}_2$  развивается острый процесс, через 30 дней морфологические изменения соответствуют подострой стадии, спустя 60 дней происходит хронизация воспалительного процесса с последующим прогрессированием при удлинении экспозиции до 90 дней.
3. В острый и подострый период морфологическими субстратами бронхиальной обструкции являются отек слизистой и подслизистой оболочки, ее утолщение за счет инфильтрации, усиление бронхиальной секреции и бронхоспазма.
4. При развитии хронического воспалительного процесса основу для прогрессирования вентиляционных нарушений составляют панацинарная эмфизема легких, склерозирование стенок бронхов, перибронхиальная инфильтрация и склероз, что может быть расценено как ремоделирование бронхолегочной ткани.

## Литература

1. Дидковский Н.А., Дворецкий Л.И. Наследственные факторы и местная защита при неспецифических заболеваниях легких. М.: Медицина; 1990.
2. Черняев А.Л., Самсонова М.В. Патологическая анатомия хронического обструктивного бронхита и бронхи-

альной астмы: сходства и различия. Consilium Medicum 2001; 3 (3): 108–114.

3. Augusti A., Mac Nee W., Donaldson K. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? Torax 2003; 58 (10): 832–834.
4. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М.: Филинъ; 1997.

#### Информация об авторах

Двораковская Иветта Владиславовна – д. м. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной пульмонологии и патоморфологии НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 449-68-90; e-mail: i\_dvorakovskaya@mail.ru.

Кузубова Наталья Анатольевна – к. м. н., зам. директора по научной работе НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 234-17-69; e-mail: kuzubova@mail.ru.

Фионик Анатолий Михайлович – к. м. н., зав. отделением патологической анатомии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 499-70-73.

Платонова Ирина Семеновна – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной пульмонологии и патоморфологии НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 449-68-90; e-mail: is\_platonova@mail.ru.

Лебедева Елена Сергеевна – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной пульмонологии и патоморфологии НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 449-68-20; e-mail: osmelena@mail.ru.

Данилов Лев Николаевич – д. м. н., проф., зав. отделом клинической и экспериментальной патологии органов дыхания НИИ пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова; тел.: (812) 449-68-20; e-mail: osmelena@mail.ru.

Поступила 03.12.08

© Коллектив авторов, 2009

УДК 616.233-091-092.9